



## **TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF VALPROIC ACID IN BLOOD BY FLUORESCENCE POLARISATION IMMUNOASSAY (FPIA) IN COMPARISON TO GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY (GC-MS)**

Jolanta WILIMOWSKA<sup>1</sup>, Małgorzata KŁYS<sup>2</sup>, Sebastian ROJEK<sup>2</sup>, Bartosz JENNER<sup>1</sup>, Krzysztof CISZOWSKI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Analytical Toxicology and Monitored Therapy, Collegium Medicum of Jagiellonian University, Krakow, Poland*

<sup>2</sup> *Chair and Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum of Jagiellonian University, Krakow, Poland*

<sup>3</sup> *Toxicology Clinic, Collegium Medicum of Jagiellonian University, Krakow, Poland*

### **Abstract**

The report presents the results of a comparative study of valproic acid assays performed using the fluorescence polarisation immunoassay (FPIA) technique on the Abbott AxSYM System and a developed analytical procedure based on gas chromatography – electron ionisation mass spectrometry (GC-MS). A specific method (GC-MS) for the quantitative determination of valproic acid in human plasma has been validated and presented in this paper. Valproic acid was extracted from acidified plasma by ethyl acetate and converted to its trimethylsilyl derivative, giving ions at  $m/z$  201, which were used in quantitative analysis. Material for analysis included 41 samples of blood collected from six poisoned patients who took a toxic dose of valproic acid with the aim of committing suicide. They had a history of epilepsy or mood disturbances and were treated with valproic acid alone or in combination with psychotropic drugs. A comparison of the FPIA results with those obtained by a reference method (GC-MS) showed no statistical difference. The correlation coefficient was 0.9814. The good correlation between the two methods, the simplicity and short run time of the FPIA could make it useful in clinical practice. The reference GC-MS method may be used in a study of metabolic profiling of valproic acid.

### **Key words**

Valproic acid; FPIA; GC-MS; Human serum.

*Received 31 December 2007; accepted 7 January 2008*

### **1. Introduction**

Valproic acid (VPA, 2-propylvaleric acid, 2-propylpentanoic acid) is a bifurcated fatty acid present on the pharmaceutical market since 1967, when it was licensed in France as the anticonvulsant drug Depakine. At the same time, its mood improving activity also began to be exploited in the treatment of patients suffering from affective disorder and in 1995, the American Federal Drug Administration Agency authorised

valproic acid in the treatment of mania accompanying bipolar disorder. The application of valproic acid gradually extended to other neurological and psychiatric disorders, including prevention and treatment of migraine, the control of neuropathic pain, behaviour disorders with panic episodes, aggression and other conditions [12]. Research results published during recent years have indicated a new property of valproic acid – anticancer activity and its application in the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS) and

acute monocytic leukemia (AML). The mechanism of this activity is probably connected with histone deacetylation inhibition by valproic acid, which leads in effect to differentiation and apoptosis of malignant cells [8,13].

Wide use of valproic acid preparations has increased the frequency of overdoses and acute poisonings with this drug [9]. In 2006, the American Association of Poison Control Centres (AAPCC) listed 8627 poisoning cases with valproic acid preparations, including a single fatal case [7]. During 2002 and 2003, 50 patients were hospitalised or treated at the first-aid room at the Toxicological Clinic CM JU in Krakow, but no fatal cases were observed [23]. The Department of Forensic Medicine also did not record any deaths following valproic acid poisoning; however, valproic acid was detected in a few cases of multi-drugs poisonings (statistics of the Department of Forensic Medicine).

Despite the fact that valproic acid is a drug of low toxicity, intense side effects may arise during long-term treatment. These include body mass increase, ovary cyst, tremor, coma, pancreatitis and liver damage. Side effects are more common and severe in infants and young children, especially during polytherapy with other antiepileptic drugs. Within this age group, teratogenic activity of this drug has also been observed [6, 11, 13, 21].

According to data from the literature and our own research, the course of poisoning with valproic acid preparations is mild in most cases; severe overdoses, where the patient's life is in danger, are rare. The most common symptoms are connected with depressive activity on the central nervous system, starting from amnesia, disorientation and hypersomnia, which develop, together with an increasing concentration of valproic acid, into disturbances of consciousness, coma and respiratory failure. Among other life and health threatening symptoms, hyperammonemia, metabolic acidosis, hypotension, tachycardia, myeloid depression and pulmonary edema should be mentioned [6, 21].

Intoxications with valproic acid preparations require application of a fast and reliable analytical method which allows determination of the concentration of valproic acid in the patient's serum, estimation of the toxicity level, and also monitoring of drug elimination from the body. The variability of valproic acid pharmacokinetics and numerous pharmacokinetic interactions necessitate monitoring of drug concentration in the blood during treatment with the drug.

Immunoassay methods (the fluorescence polarisation immunoassay, FPIA and the enzyme multiplied

immunoassay technique, EMIT) are preferable for the determination of valproic acid in serum because of their rapidity and simplicity; however, the occurrence of cross-reactivity when these methods are used means that the analyst must apply reference methods. Analytical procedures using chromatographic techniques: gas chromatography coupled with flame ionisation detector (FID), high performance liquid chromatography, gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS) have been developed as reference methods for the determination of valproic acid concentrations by immunological methods [6]. GC-MS with various ionisation and derivatisation techniques has been applied in most methodological studies describing the determination of valproic acid [1, 3, 10, 14, 22].

The aim of this study was to compare methods of valproic acid determination in blood and to evaluate their suitability for the diagnostics of patients poisoned with VPA and for therapeutic drug monitoring during antiepileptic treatment.

## 2. Case study

The research encompassed six patients who were admitted to the Toxicology Clinic, Collegium Medicum JU in Krakow and were suspected of having been poisoned with Depakine Chrono or Convulex. Three of the patients had taken other psychotropic drugs together with the valproic acid preparations. In most cases, the overdosed drugs belonged to the patients, who were being treated for epilepsy or mood disorder. All examined patients took these drugs for suicidal purposes.

The patients' clinical state was rated according to the PSS (Poison Severity Score) as a poisoning of low, medium or high severity. The applied symptomatic treatment improved the patients' condition and they were released home or directed for further psychiatric treatment. Detailed information about patients, medicines taken, intoxication symptoms and the applied treatment is presented in Table I.

## 3. Materials and methods

### 3.1. Biological material

Biological material was: blood collected from six patients during the first, second, third and fourth day (24 hr day) of hospitalisation at the Toxicology Clinic

TABLE I. INFORMATION ABOUT PATIENTS INTOXICATED BY VALPROIC ACID PREPARATIONS

Patient	Sex	Age	Dose [g]	Time since intoxication [h]	Clinical symptoms	Treatment	Other administered drugs	Other illnesses
WL	M	41	46	1	I° of coma acc. to Matthew, blood arterial pressure – 150/80 mm Hg, pulse – 120/min	Stomach rinsing, medical carbon, laxative salt, intravenous fluids, alkalisation	Chlorprothixen, Permazinum, Amitriptylinum, Cloraxen, Hydroxyzinum, Diphergan, Amizepin, Atarax	Addiction to alcohol, epilepsy
AM	F	36	20	1	Little bit slowed down	Medicinal carbon	Cloraxen	Epilepsy
TM	M	41	20	5	Stammering, slowed down, fulfils simple instructions, qualitative and quantitative disturbances of consciousness, periodically considerable motor stimulation with symptoms of hallucinations, circulatory stability with transitory tachycardia	Supplementation of fluids and electrolytes, passive oxygen therapy	Neurotop, haloperidol	Epilepsy
KT	M	27	–	~18	Slowed down psychomotorically with disturbances of balance, unwillingly answering questions, I° coma acc to Matthew scale, normal orientation to time, place and person (the patient free from autopsychic and allopsychic orientation disturbances)	Symptomatic treatment	–	Epilepsy
MM	F	51	–	~24	Mixed, shallow verbal contact, respiration efficient, blood arterial pressure – 110/70 mm Hg, pulse – 80/min	Symptomatic treatment	–	Alcoholic intoxication (ethanol – 2.96 g/l), asthma, epilepsy
CJ	M	24	12	29	Blood arterial pressure – 150/90 mm Hg, pulse – 65/min	Stomach rinsing, medical carbon, laxative salt, intravenous fluids	–	Depression syndrome with personality disorders

CM JU and also control serum obtained from a blood bank in Krakow for developing and validating the analytical method.

### 3.2. Standards and reagents

Valproic acid was purchased from SIGMA (Poznań, Polska) and the deuterated internal standard (IS), VPA-d<sub>4</sub> (2-(propyl-1,1-d<sub>2</sub>)pentanoic-3,3-d<sub>2</sub> acid) was obtained from CDN Isotope Inc. (Quebec, Canada). The derivatisation reagent BSTFA with 1% TMCS (bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide with trimethylchlorosilane) and also pyridine were ordered from SIGMA (Poznań, Poland). The remaining reagents: methanol, ethyl acetate, buffer solution (pH = 3) of analytical grade were purchased from POCH (Gliwice, Poland). Aqua pro injectione by B. Braun (Melsungen, Germany) was used as distilled water.

### 3.3. Analytical procedures

#### 3.3.1. Fluorescence polarisation immunoassay method (FPIA)

Determination of valproic acid in serum by the FPIA method was performed using the AxSYM System (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Abbott Park, USA) with software version 5.20. Necessary reagents to perform the analysis were purchased from Abbott Laboratories. Reagent 1 contained valproic acid antibodies in phosphoric buffer solution; reagent 2 was valproic acid conjugated with fluorescein in TRIS buffer solution.

A calibration plot was prepared using six standard solutions at concentrations: 0, 12.5, 25, 50, 100 and 150 g/ml. Control solutions at concentrations: 37.5, 72.5, 124.5 g/ml were used to evaluate the reliability of the method.

Validation parameters were worked out and printed in a leaflet attached to the Valproic Acid Assay reagent by Abbot Laboratories [4]. According to these instructions, the determined cut-off value was 0.7 g/ml. The cut-off corresponds to the lowest measurable concentration which can be distinguished from the zero value at a confidence level of 95%.

The method was linear within the range from 0 to 150 g/ml. The inter-day variance coefficients determined for control solutions at concentration levels: 37.5, 72.5 and 124.5 g/ml were 3.4%, 4.1% and 3.5%, respectively.

The specificity of the test for valproic acid was defined for 3-ketovalproic acid, the main metabolite of valproic acid. At a metabolite concentration corre-

sponding to a high concentration level of valproic acid in plasma of patients suffering from epilepsy (16 g/ml), 3-ketovalproic acid showed cross-reactivity below 10%, for both lower (50 g/ml) and upper (100 g/ml) limits of the valproic acid therapeutic range. Other valproic acid metabolites (3-hydroxyvalproic acid, 4-hydroxyvalproic acid, 4-en-valproic acid, 2-propylglutaric acid, 5-hydroxyvalproic acid), at the concentrations corresponding to high levels in plasma of epileptic patients revealed that the reading error was below the cut-off of the method.

#### 3.3.2. Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS)

##### 3.3.2.1. Standard and control solutions

1 mg/ml stock solutions of valproic acid and deuterated internal standard (IS) were prepared by diluting standard solutions of valproic acid and VPA-d<sub>4</sub> with methanol. Working solutions of valproic acid were made by further diluting the stock solution with distilled water to concentrations of 10 and 100 g/ml. The stock solution of VPA-d<sub>4</sub> was diluted with distilled water to obtain the working standard of 5 g/ml. The stock solutions of valproic acid and its deuterated internal standard were kept at +4°C. The working solutions were prepared fresh daily.

Standard solutions were prepared by spiking the control material (serum free from extraneous substances) with the analyte within the range of concentrations from 5 to 150 g/ml. Control samples at low – 20 g/ml and high – 75 g/ml concentrations were prepared in the same manner.

##### 3.3.2.2. Sample preparation

100  $\mu$ l of serum (standard, control and investigated samples) was put into Eppendorf vial of 2 ml capacity, then diluted 10 times with distilled water. 100  $\mu$ l of solution was pipetted and spiked with 100  $\mu$ l of internal standard – 5 g/ml deuterated valproic acid. The sample was then acidified with 500  $\mu$ l of citric buffer solution (pH = 3), and then extracted with 500  $\mu$ l of ethyl acetate for 15 minutes at room temperature. After a 6 minute long centrifugation, the organic solvent was transferred to a clean vial and subsequently evaporated under a stream of nitrogen.

30  $\mu$ l of derivatisation reagent containing BSTFA/pyridine (1:1) was added to the dry residue, and after careful vortexing, the sample was thermostated at ca. 70°C for 20 minutes.

### 3.3.2.3. Equipment

The TRACE gas chromatography system (Thermo Electron, USA) coupled with the Polaris Q mass spectrometer (Thermo Electron, USA) was used. It was equipped with a quadrupole ion trap and an electron impact ionisation device.

### 3.3.2.4. Chromatographic separation

Chromatographic separations were conducted using a factorFOUR capillary column, 30 m  $\times$  0.25 mm I. D., film thickness 0.25  $\mu$ m (Varian, USA). Helium at a constant flow of 1.5 ml/min was used as the carrier gas.

The temperature of the injector was 260°C. The column temperature program started from 50°C, then the temperature was ramped 40°C/min, to reach 300°C, which was then held for further 2 minutes. 1  $\mu$ l of the derivatised sample was injected on the column.

### 3.3.2.5. Detection parameters

The mass spectrometer operated at electron energy of 70 eV, the temperature of the ion source and the transfer line was 230°C and 280°C, respectively. Xcalibur software was applied to molecular ions collection, which was performed in the full scan mass spectrum within the range from 50 to 350 m/z for both substances.

### 3.3.2.6. Calibration curve and quantitative analysis

Quantitative analysis was performed using a calibration plot prepared by analysis of control serum samples spiked with valproic acid at concentration levels: 5, 10, 25, 50, 100, 150  $\mu$ g/ml and with the deuterated internal standard (IS) VPA-d<sub>4</sub> at 5  $\mu$ g/ml. Each standard sample was analysed in triplicate. The calibration curve was plotted using the ratio of the valproic acid peak area to the internal standard peak area. Regression coefficients, including slope and intercept were calculated using the least square method. The linearity, defining the ability of the method to obtain results directly proportional to the determined substance was expressed by a regression equation ( $y = ax + b$ ) and a correlation coefficient,  $r$ .

### 3.3.2.7. Method validation

The method selectivity was investigated by injecting five different serum extracts onto a chromatographic column. The limit of detection (LOD) – the lowest detectable concentration, though not necessarily determined with the required quantitative accuracy, was calculated from the signal to noise ratio (for a peak area) which was estimated to be greater than 3:1. The

limit of quantification (LOQ) was the lowest concentration which could be determined with satisfactory precision ( $RSD < 15\%$ ) and accuracy (relative error  $< 15\%$ ) and it was estimated as the concentration giving an analytical signal ten times greater than the noise level. 5 control samples were analysed in order to determine these parameters.

Intra- and inter-group precision and accuracy were determined by the analysis of five control samples a day at low and high concentrations on three successive days. Average values, standard deviations, relative standard deviations and bias were calculated on the basis of obtained results. The precision of the method expressing the concordance between the separate results of analyses repeated many times was defined by the percent relative standard deviation (% RSD). RSD was calculated by dividing the standard deviation by the average value obtained from the calibration plot. The accuracy, defining the concordance between the real concentration and that found during the analysis was presented as the value of the method bias calculated using the overall systematic error (% bias). The bias was calculated by dividing the difference between the average calculated concentration and the reference concentration by the average investigated concentration.

The extraction recovery or yield (%) defining the ability to isolate the investigated compound from the biological sample by the applied extraction procedure was determined five times for two concentration levels in control samples. The relative extraction yield was estimated by spiking the first series of serum samples with the working solution of the internal standard (IS), then spiking the second series after the extraction but before the evaporation step. The average percent relative recovery was obtained by comparing the signal of the investigated compound in the first series with the signal acquired in the second series. The total recovery was also evaluated by comparison of the analyte signal recorded for methanolic standard solutions.

## 3.4. Statistical analysis

A linear regression analysis and a t-Student test for paired samples were performed on Statistica 6.1 software. Determined VPA concentrations were expressed as mean concentration, standard deviation and the correlation between VPA concentrations obtained by the applied methods was described by a linear regression equation.

### 3.5. Toxicokinetic studies

The biological half-life ( $t_{1/2}$ ) and the elimination rate constant ( $k_{el}$ ) were calculated from the last points of the concentration-time curve using pharmacokinetic software (Spline Program for Pharmacokinetic Moment Analysis, DuPont Pharmaceuticals; Newark, USA).

## 4. Results

The initial phase of the research consisted of the development of a sensitive and selective method of determination of valproic acid and validation of this method.

### 4.1. Validation of method for determination of valproic acid in serum by GC-MS

Identification of the determined analyte was performed on the basis of retention time and selected ions

specific for valproic acid ( $m/z = 129, 145, 201$ ). Retention time of valproic acid and its deuterated analogue equals 3.98 min (Figure 1). Qualitative analysis was performed using the ion of  $m/z = 201$  for valproic acid and of 205 for deuterated analogue (VPA-d<sub>4</sub>).

The selectivity of the method is satisfactory, as no endogenous agents present in serum interfere with the analytes. The calibration curve, examined at six measuring points, each of six repetitions, showed linearity within a range of 5–150 g/ml. The correlation coefficient  $r$  of the obtained calibration curve was 0.9959. In the described analytical conditions, the limit of detection (LOD) equals 2.6 g/ml, and the limit of quantitation (LOQ) was estimated as 5 g/ml.

The precision of the method was evaluated at two concentrations (10 g/ml and 100 g/ml) repeated five times per day for three successive days. The relative standard deviations for repetitions of determined concentrations on the same day were: 2.6–9.4% for 10 g/ml and 7.9–9.4% for 100 g/ml. Precision between days equalled 11.9% for 10 g/ml and 1.8% for 100 g/ml. Control solutions at concg/ml respectively.

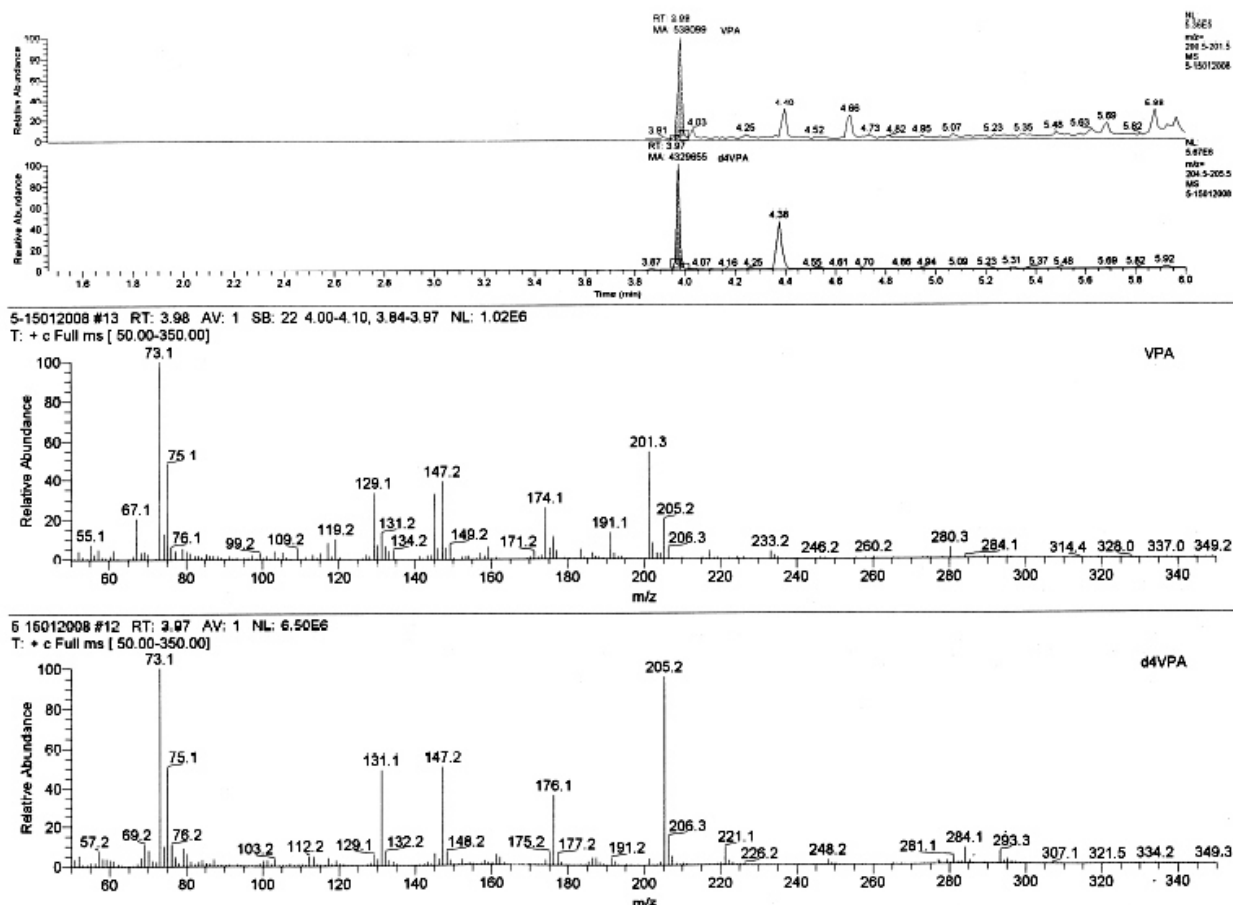


Fig. 1. Chromatograms and mass spectra of valproic acid and its deuterated analogue VPA-d<sub>4</sub> (IS) in extract from serum of a patient intoxicated by Convulex.

The accuracy estimated for control samples (20 g/ml and 75 g/ml) oscillated from 5.8% to 2.9%.

Extraction efficiency was evaluated for two concentrations of control samples (20 g/ml and 75 g/ml) in five repetitions. Relative recovery ranged from 92.2 to 97.8%, and total recovery was approximately 81%.

#### 4.2. Comparison of methods for determination of valproic acid – statistical analysis

The developed and validated GC-MS method with electron impact ionisation as well as the FPIA method was applied to determination of VPA in serum of six patients intoxicated by valproic acid preparations, treated in the Toxicology Clinic of Collegium Medicum JU in Krakow. Material was collected several times during hospitalisation in order to monitor the elimination of the compound from the organism.

The mean concentrations of valproic acid (+/-SD) calculated for 41 samples analysed by FPIA and GC-MS methods were 150.6 g/ml (+/-139.6) and 155.0 g/ml (+/-135.8) respectively.

The dependence between the concentrations of valproic acid in serum obtained by the FPIA method compared to those obtained by the GC-MS method was described by the linear regression equation:  $CVPA/FPIA = 1.02 \quad CVPA/GC-MS - 7.30$ . The correlation coefficient was 0.9814. This correlation is presented in Figure 2.

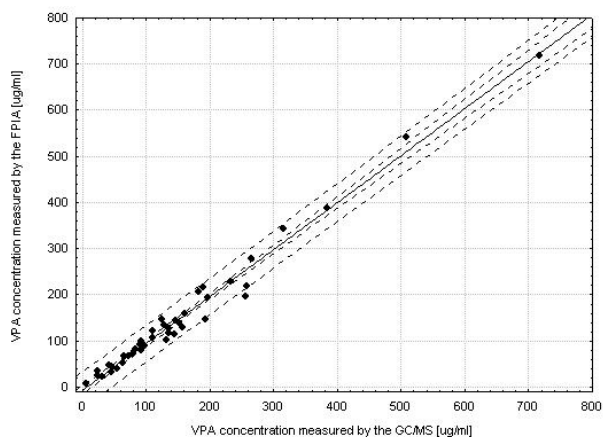


Fig. 2. Correlation between the values of valproic acid in serum of examined patients determined by FPIA relative to GC-MS. Regression equation:  $CVPA/FPIA = 1.0182 \quad CVPA/GC/MS - 7.3007$ . Outer lines define the 95% confidence range for observed values. Inner lines define the 95% range for predicted values.

In the conducted research, the correlation between concentrations of valproic acid determined by FPIA and GC-MS and relative differences in concentrations of valproic acid obtained by these methods are shown in Figure 3.

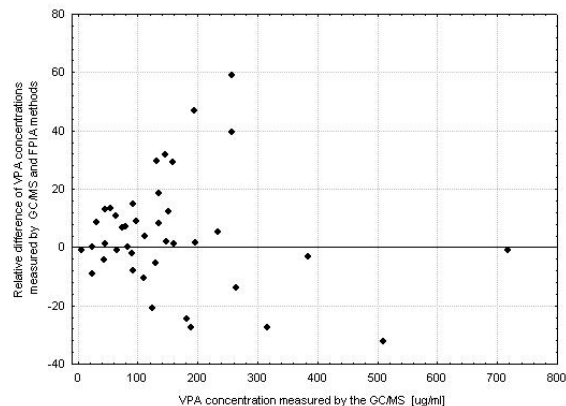


Fig. 3. Correlation between relative difference of valproic acid concentrations obtained by FPIA and GC-MS, and concentration obtained by GC-MS only.

#### 4.3. Results of assays of valproic acid in blood using FPIA and GC-MS methods

During hospitalisation of patients in the Toxicology Clinic CM JU, determination of valproic acid was performed each time after collection of blood using the FPIA method. Remaining material was secured for further analysis by GC-MS at the Department and Institute of Forensic Medicine CM JU. Results of determination are shown in Figure 4. For the time of administration of the toxic dose ( $t = 0$ ), the assumed concentration was 50 µg/ml (minimum therapeutic dose of VPA), which points to therapeutic use of valproic acid by patients before intoxication.

#### 4.4. Toxicokinetic parameters

Results of concentrations of valproic acid in serum collected at various times after admission to hospital were used for calculation of selected toxicokinetic parameters: Biological half-life ( $t_{1/2}$ ) and elimination rate constant ( $k_{el}$ ). The biological half-life and elimination rate constant of valproic acid calculated for 5 intoxicated patients varied from 16.2 to 28.1 (mean  $22.9 \pm 5.7$ ) and from 0.043 to 0.024  $h^{-1}$  (mean  $0.032 \pm 0.009$ ) respectively. In the case of one patient, the calculated values of  $t_{1/2}$  ( $k_{el}$ ) were 57.6 h ( $0.012 \text{ h}^{-1}$ ). Changes of concentrations of valproic acid during elimination for the investigated group of patients are shown on charts (Figure 4).

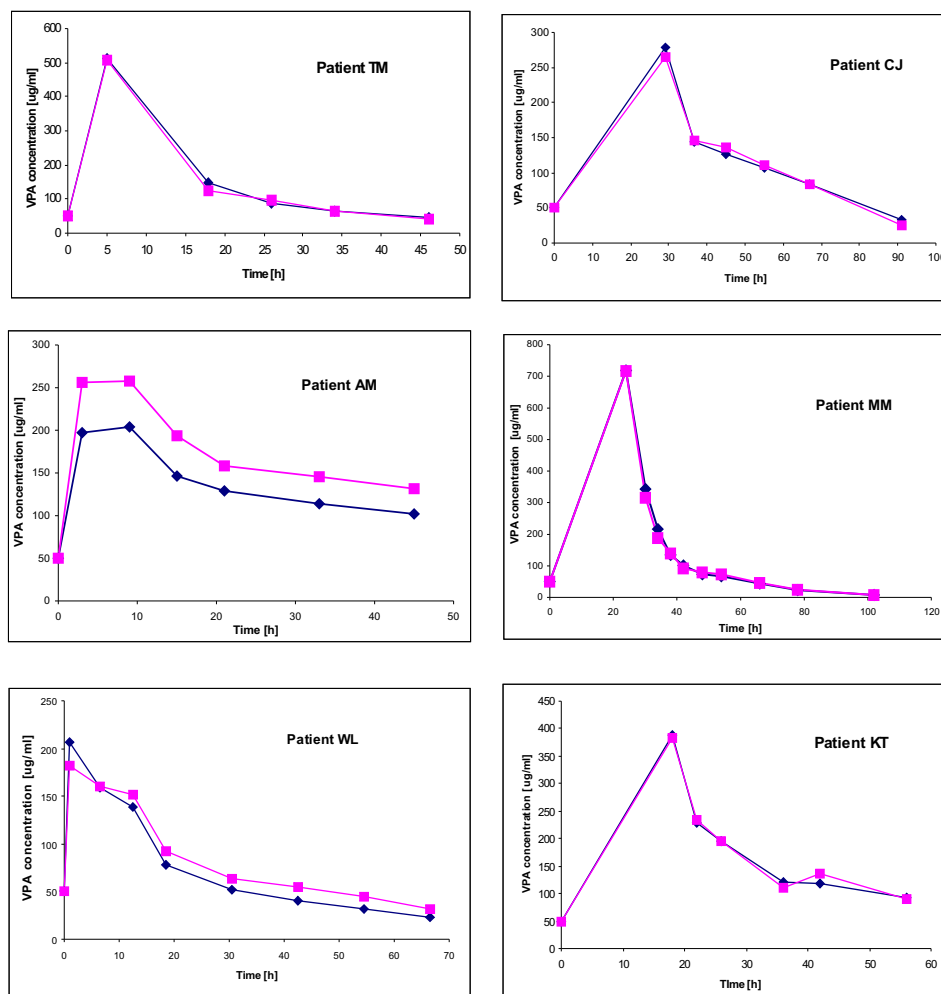


Fig. 4. Pharmacokinetic profile of patients intoxicated by valproic acid; ■ - determined on the basis of GC/MS analyses, - determined on the basis of FPIA analyses.

## 5. Discussion

The considerable diversity of pharmacokinetics of valproic acid depending on age and accompanying antiepileptic therapy makes it advisable to monitor drug concentrations for therapeutic purposes [2]. Individualisation of dosage based on therapeutic monitoring of a drug improves the effectiveness and safety of pharmacological therapy; however, numerous pharmacokinetic interactions, accompanying psychiatric diseases, difficulty and often inefficacy of popular treatment by valproic acid preparations, lead to increasingly common cases of overdosing. The liability of valproic acid kinetics during intoxication dependent on pharmacokinetics at therapeutical doses necessitates monitoring of elimination of the drug from the organism. That is why development of a sensitive and specific method of determination of valproic acid in serum is so important in order to improve the safety of

antiepileptic therapy and effectiveness of treatment of acute VPA poisonings.

Staff working at the Laboratory of Analytical Toxicology and Monitored Therapy CM JU, Krakow use the FPIA method to determine VPA in blood when diagnosing patients intoxicated by this compound. An unquestionable advantage of this method is the speed of the analysis of the studied substance, as it can be performed directly in biological material. This helps a quick diagnosis to be made and suitable treatment to be initiated. The speed and simplicity of VPA determination by the immunological method determines the usefulness of the FPIA technique for clinical purposes. FPIA is not, however, a specific method, which is why compounds such as metabolites having a similar chemical structure may show cross reactivity. The manufacturer of the test guarantees the specificity of VPA determination for concentrations within the therapeutic range: 50 to 120 µg/ml. Data published in the



literature up to now have not provided any information about cross reactivity of valproic acid metabolites in acute poisonings.

In the presented study, an attempt was made to assess the application of the FPIA method to toxic concentrations of VPA compared to a reference method. The developed reference method for determination of valproic acid in serum uses the GC-MS technique with application of a deuterated analogue as an internal standard. The performed validation of the GC-MS method points to its specificity, sensitivity, repeatability and linearity at a useful level for routine analyses of valproic acid at therapeutic concentrations. Limitation of the linearity of the method to 150 g/ml was linked with the occurrence of overloading of the ion trap at higher concentration values; thus blood samples collected from poisoned patients were diluted by distilled water, and the result was multiplied by the appropriate dilution factor.

The GC-MS method, which is characterised by high specificity, allows the determination of valproic acid and its metabolites with the highest credibility. It can be utilised in investigation of the metabolic profile of the medicine, which is going to be the subject of the next publication.

A comparison of valproic acid concentration values obtained by the FPIA method and the GC-MS method was conducted on 41 samples collected from 6 patients of the Toxicology Clinic CM JU, Krakow. According to performed linear regression analysis, it was proved that there are no statistically significant differences between the results obtained by the FPIA method and the reference GC-MS method. The dependence of results of valproic acid concentrations were described by a linear regression equation, for which standard errors of equation coefficients were estimated as follows:  $SD = 0.022$  for the directional coefficient and  $SD = 4.606$  for free expression. Values of regression coefficients were contained in the 95% confidence interval. The correlation coefficient of results obtained by the two methods was 0.9814. It can thus be stated that both methods of determination of valproic acid are equivalent.

The T-Student test for dependent samples showed no statistically significant difference between mean concentration values of VPA determined by both methods within a 95% confidence interval. ( $t_{40} = 1.49$ ,  $p = 0.1428$ ). Therefore it cannot be said that mean concentration values obtained by FPIA differ from mean results of concentrations values determined by the GC-MS method. No statistically important difference was shown for standard deviations for the two methods.

The results of the conducted research show that the difference between the concentration of valproic acid determined by FPIA and GC-MS does not depend on the concentration itself. This problem is illustrated in Figure 3.

Authors of earlier scientific publications compared assays of valproic acid determined by immunological methods with HPLC or GC as reference methods. Also, this research showed no significant differences between the results of VPA assay obtained by mentioned techniques [5, 15, 17, 18, 20].

Validated FPIA and GC-MS methods were used for determination of valproic acid in serum of patients poisoned by VPA preparations. Samples were collected from six patients at admission to hospital, then twice during the first and second 24 hours in order to monitor the elimination of the drug, and after that once a day till subtherapeutic concentrations were obtained.

Obtained results of VPA concentrations at admission to hospital for all six patients exceeded toxic doses ( $> 150 \mu\text{g/ml}$ ), and ranged between 197.2 and 718.5 g/ml. Spiller et al. showed a correlation between the degree of intoxication and the concentration of valproic acid. A clinical picture of valproic acid poisoning with limited toxicity was present for patients with concentrations of VPA lower than 450 g/ml, whereas concentrations above 850  $\mu\text{g/ml}$  were accompanied by serious life-threatening clinical symptoms, such as coma, respiratory insufficiency or metabolic acidosis [19]. In the cases of lethal poisonings, reported concentrations of valproic acid were within the range of 520 g/ml to 1970 g/ml [17]. There was no serious threat to life in the six analysed patients and the degree of poisoning was classified as light to heavy.

Doses of valproic acid taken by examined patients, and afterwards determined on the basis of medical history in the range of 12 to 46 g, reached toxic dose values (from 19 to 45 g), at which stage, severe poisoning symptoms were observed. Valproic acid is, however, a drug of relatively low toxicity and complete recovery was described after doses as high as 75 g [16].

During monitoring of elimination of valproic acid from the organism of poisoned patients, a pharmacokinetic profile typical for a dualcompartment model was observed, and elimination occurred according to first-order kinetics. Mean values of biological half-life ( $t_{1/2}$ ) and elimination rate constant ( $k_{el}$ ) calculated from concentrations of valproic acid obtained by the FPIA method were  $22.9 \pm 5.7$  h and  $0.032 \pm 0.009 \text{ h}^{-1}$  respectively and were consistent with earlier analyses, except one patient, whose  $t_{1/2}$  lengthened to 57.6 h and  $k_{el}$  was  $0.012 \text{ h}^{-1}$ . The biological half-life of valproic acid at therapeutic doses was within the range of 8–21.5 h

(mean  $12.2 \pm 3.7$  h). As a result of overdosing, it may lengthen up to two or three times to a value of  $t_{1/2}$  above 30 h [21]. Past research showed that  $t_{1/2}$  in valproic acid intoxication ranged from 8.8 to 30.9 h (mean 8.8 h) [23].

## 6. Summary

FPIA and electron ionisation GC-MS methods may be used for routine analyses for determination of valproic acid during monitored therapy as well as for patients intoxicated by valproic acid preparations. It was also shown that results of VPA concentrations in serum determined by FPIA are not statistically different from the results obtained by the reference method (GC-MS) which may indicate that there is no cross reactivity of antibodies during FPIA analysis.

Good correlation between results obtained by the FPIA method and the GC-MS reference method as well as speed and simplicity of the analyses confirm the usefulness of the FPIA method for clinical purposes.

## References

- Abbott F. S., Burton R., Orr J. [et al.], Valproic acid analysis in saliva and serum using selected ion monitoring (electron ionization) of the tert.-butyldimethylsilyl derivatives, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 1982, 227, 433–444.
- Adamska-Dyniewska H., *Terapia monitorowana*, Wydawnictwo TTM, Łódź 1994.
- Anari M. R., Burton R. W., Gopoul S. [et al.], Metabolic profiling of valproic acid by cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes using negative-ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 2000, 742, 217–227.
- AxSYM System Leaflet, Valproic acid, Abbott Laboratories Diagnostic Division, Wiesbaden 2004.
- Braun S. L., Tausch A., Vogt W. [et al.], Evaluation of a new valproic acid enzyme immunoassay and comparison with a capillary gas-chromatographic method, *Clinical Chemistry* 1981, 27, 169–172.
- Brent J., Wallace K. L., Burkhart K.K. [et al.], *Critical care toxicology. Diagnosis and management of the critically poisoned patient*, Elsevier, Philadelphia 2005.
- Bronstein A. C., Spyker D. A., Cantilena Jr L. R. [et al.], 2006 annual report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS), *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 2007, 45, 815–917.
- Cheng H., Liu Z., Blum W. [et al.], Quantification of valproic acid and its metabolite 2-propyl-4-pentenoic acid in human plasma using HPLC-MS/MS, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 2007, 850, 206–212.
- Ciszowski K., Jenner B., Wilimowska J., *Obraz kliniczny ostrego zatrucia kwasem walproinowym w kontekście ilościowych oznaczeń ksenobiotyku we krwi*, *Przegląd Lekarski* 2006, 63, 447–453.
- Darius J., Meyer F. P., Sensitive capillary gas chromatographic-mass spectrometric method for the therapeutic drug monitoring of valproic acid and seven of its metabolites in human serum, Application of the assay for a group of pediatric epileptics, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 1994, 656, 343–351.
- Dupuis R. E., Lichtman S. N., Pollack G. M., Acute valproic acid overdose, Clinical course and pharmacokinetic disposition of valproic acid and metabolites, *Drug Safety* 1990, 5, 65–71.
- Grunz H., Walden J., *Kwas walproinowy w zaburzeniach afektywnych dwubiegunowych*, Urban & Partner, Wrocław 2002.
- Kuendgen A., Strupp C., Aivado M., Bernhardt A., Hildebrandt B. [et al.], Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid, *Blood* 2004, 104, 1266–1269.
- Leis H. J., Windischhofer W., Rechberger G. N. [et al.], Synthesis of [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]valproic acid and its use as an internal standard for the quantitative measurement by gas chromatography – electron ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 2003, 784, 69–75.
- Leroux M., Budnik D., Hall K. [et al.], Comparison of gas-liquid chromatography and EMIT assay for serum valproic acid, *Clinical Biochemistry* 1981, 14, 87–90.
- Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., *Clarke's analysis of drugs and poisons*, Pharmaceutical Press, London 2004.
- Poklis A., Poklis J. L., Trautman D. [et al.], Disposition of valproic acid in a case of fatal intoxication, *Journal of Analytical Toxicology* 1998, 22, 537–540.
- Richard L., Bugugnani M. J., Fouye H. [et al.], Valproic acid, a comparison between 2 methods of determination: immunoenzymology and high performance liquid chromatography, *Annales de Biologie Clinique* 1985, 43, 279–284.
- Spiller H. A., Krenzelok E. P., Klein-Schwartz W. [et al.], Multicenter case series of valproic acid ingestion: serum concentrations and toxicity, *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 2000, 38, 755–760.
- Steijns L. S., Bouw J., van der Weide J., Evaluation of fluorescence polarization assays for measuring valproic acid, phenytoin, carbamazepine and phenobarbital in serum, *Therapeutic Drug Monitoring* 2002, 24, 432–435.

21. Sztajnkrzyca M. D., Valproic acid toxicity: overview and management. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* 2002, 40, 789–801.
22. Tatsuhara T., Muro H., Matsuda Y. [et al.], Determination of valproic acid and its metabolites by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring, *Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications* 1987, 399, 183–195.
23. Wilimowska J., Florek J., Piekoszewski W., Disposition of valproic acid in self-poisoned adults, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2006, 99, 22–26.

---

**Corresponding author**

Jolanta Wilimowska  
Pracownia Toksykologii Analitycznej  
i Terapii Monitorowanej CM UJ  
Os. Złotej Jesieni 1  
PL 31-826 Kraków  
e-mail: jwilimowska@cm-uj.krakow.pl

---

## ANALIZA TOKSYKOLOGICZNA KWASU WALPROINOWEGO WE KRWI METODĄ IMMUNOFLUORESCENCJI W ŚWIETLE SPOLARYZOWANYM (FPIA) W KONFRONTACJI Z CHROMATOGRAFIĄ GAZOWĄ SPRZĘŻONĄ ZE SPEKTROMETRIĄ MAS (GC-MS)

### 1. Wstęp

Kwas walproinowy (VPA, kwas 2-propylowalerynianowy, kwas 2-propylopentanowy) jest rozgałęzionym kwasem tłuszczowym znanym na rynku farmaceutycznym od roku 1967. Od bieżącego roku został on dopuszczony do obrotu we Francji jako lek przeciwpadaczkowy pod nazwą Depakine. W tym samym czasie zaczęto również wykorzystywać jego działanie poprawiające nastrój u pacjentów cierpiących na chorobę afektywną, a w roku 1995 amerykańska Agencja ds. Dopuszczania Leków do Sprzedaży (Federal Drug Administration) zatwierdziła kwas walproinowy w leczeniu manii towarzyszącej chorobie dwubiegunowej. Zastosowanie kwasu walproinowego stopniowo poszerzało się o inne schorzenia neurologiczne i psychiatryczne, takie jak m.in. profilaktyka i leczenie bólu migrenowego, kontrola bólu neuropatycznego, zaburzenia zachowania z napadami paniki, zaburzenia zachowania z agresją i inne [12]. Doniesienia naukowe ostatnich lat wskazują na odkrycie nowej właściwości kwasu walproinowego, jakim jest działanie przeciwnowotworowe i wykorzystanie go w leczeniu zespołu mielodysplastycznego (MDS) oraz ostrej białaczki szpikowej (AML). Mechanizm tego działania wiąże się prawdopodobnie z zahamowaniem deacetylacji histonów przez kwas walproinowy i w efekcie prowadzi do różnicowania i apoptozy komórek złośliwych [8, 13].

Szerokie wykorzystanie preparatów kwasu walproinowego zwiększyło częstość występowania przedawkowań i ostrych zatruc tym lekiem [9]. W 2006 roku Amerykańskie Stowarzyszenie Kontroli Ostrego Zatrucia (AAPCC) zanotowało 8627 przypadków zatrucia preparatami kwasu walproinowego, z czego 1 przypadek zakończył się zgonem pacjenta [7]. W Klinice Toksykologii CM UJ w Krakowie w latach 2002–2003 hospitalizowano oraz przyjęto ambulatoryjnie 50 pacjentów, wśród których nie obserwowano przypadków zakończonych zgonem pacjenta [23]. Również w Zakładzie Medycyny Sądowej nie zanotowano zgonów po zatruciu kwasem walproinowym, jakkolwiek w zatruciu wielolekowym stwierdzono jego obecność w kilku przypadkach (statystyki Zakładu Medycyny Sądowej).

Pomimo, że kwas walproinowy należy do leków o niskiej toksyczności, podczas przewlekłej terapii mogą pojawić się nasilone działania niepożądane, w tym przyrost masy ciała, torbielowość jajników, drżenia, śpiączka, zapalenie trzustki i uszkodzenie wątroby. U niemowląt

i małych dzieci objawy niepożądane są częstsze i groźniejsze, szczególnie podczas politerapii z innymi lekami przeciwpadaczkowymi. W tej grupie wiekowej obserwujemy dodatkowo działanie teratogenne leku [6, 11, 13, 21].

Jak wynika z danych zawartych w literaturze przedmiotu oraz z badań własnych, przebieg zatrucia preparatami kwasu walproinowego ma w większości przypadków charakter łagodny, rzadko zdarzają się ciężkie przedawkowania z objawami zagrażającymi życiu pacjenta. Najczęstsze objawy dotyczą działania depresyjnego na OUN, począwszy od splątania, dezorientacji i senności, a w miarę wzrostu stężenia kwasu walproinowego rozwijając się w zaburzenia świadomości oraz śpiączkę z niewydolnością oddechową. Wśród innych objawów zagrażających zdrowiu i życiu pacjenta należy wymienić hiperamonemię, kwasicę metaboliczną, spadek ciśnienia tętniczego krwi, tachykardię, depresję szpiku kostnego i obrzęk płuc [6, 21].

Zatrucia preparatami kwasu walproinowego wymagają zastosowania szybkiej i wiarygodnej metody analitycznej pozwalającej oznaczyć stężenie kwasu walproinowego w surowicy pacjenta, określić stopień toksyczności, jak również monitorować eliminację leku z organizmu. Zmienność farmakokinetyki kwasu walproinowego oraz liczne interakcje farmakokinetyczne wymuszają również prowadzenie terapii z kontrolą stężenia leku we krwi.

Preferowanymi z uwagi na szybkość i prostotę metodami analitycznymi stosowanymi do oznaczania stężenia kwasu walproinowego w surowicy pozostają metody immunologiczne (metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym FPIA oraz metoda immunoenzymatyczna EMIT), jednak istnienie reaktywności krzyżowej podczas oznaczeń tymi metodami stawia przed analitykiem wymóg zastosowania metod referencyjnych. Jako metody odniesienia dla oznaczeń stężeń kwasu walproinowego metodami immunologicznymi opracowano procedury analityczne z wykorzystaniem technik chromatograficznych: chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID), wysokosprawnej chromatografii cieczowej, chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS) [6]. W większości opracowań metodycznych oznaczania kwasu walproinowego zastosowano chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas, w której wyko-

rzystane są różne techniki jonizacji po wcześniejszej derywatywacji [1, 3, 10, 14, 22].

Celem niniejszej pracy było porównanie metod oznaczania kwasu walproinowego we krwi i ocena ich przydatności do celów diagnostyki pacjentów zatrutych preparatami VPA oraz do monitorowania terapii przeciwpadaczkowej.

## 2. Opis przypadków

Badania obejmowały sześciu pacjentów, którzy zostali przyjęci do Kliniki Toksykologii CM UJ w Krakowie z podejrzeniem zatrucia preparatami Depakine Chrono lub Convulex. Trzech pacjentów przyjęło preparaty kwasu walproinowego w połączeniu z innymi lekami z grupy leków psychotropowych. Przedawkowane leki w większości przypadków należały do pacjentów, którzy byli nimi leczeni z powodu padaczki lub zaburzeń nastroju. Wszyscy badani pacjenci przyjęli leki w celach samobójczych.

Stan kliniczny pacjentów na podstawie skali PSS (ang. poison severity score) został oceniony jako zatrucie stopnia lekkiego, średniego lub ciężkiego. Zastosowane leczenie objawowe doprowadziło do poprawy stanu ogólnego pacjentów, których w stanie dobrym wypisano do domu lub skierowano do dalszego leczenia psychiatrycznego. Szczegółowe informacje o pacjentach, spożytych lekach, objawach zatrucia i wdrożonym leczeniu zebrano w tabeli I.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiły: krew pobrana od sześciu pacjentów w czasie 1., 2., 3. i 4. doby hospitalizacji w Klinice Toksykologii CM UJ oraz surowica kontrolna do opracowania i walidacji metody analitycznej otrzymana z Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Krakowie.

### 3.2. Wzorce i odczynniki chemiczne

Kwas walproinowy został zakupiony w firmie SIGMA (Poznań, Polska), a deuterowany standard wewnętrzny (IS) VPA-d<sub>4</sub> (2-(propyl-1,1-d<sub>2</sub>)pentanoic-3,3-d<sub>2</sub> acid) pochodził z CDN Isotope Inc. (Quebec, Kanada). Odczynnik do derywatywacji BSTFA z 1% TMCS (bis(trimetylosililotrifluoroacetamid z trimetylochlorosilanem) oraz pirydynę zamówiono w firmie SIGMA (Poznań, Polska). Pozostałe odczynniki: metanol, octan etylu, roztwór buforowy (pH = 3) o czystości analitycznej zostały zakupione w firmie POCH (Gliwice, Polska). Wodę de-

stylowaną stanowiła *aqua pro injectione* firmy B. Braun (Melsungen, Niemcy).

### 3.3. Procedury analityczne

#### 3.3.1. Metoda immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA)

Oznaczenia stężenia kwasu walproinowego w surowicy metodą FPIA wykonywano analizatorem AxSYM System (Abbott Laboratories, Diagnostic Division, Abbott Park, Stany Zjednoczone) z wersją oprogramowania 5.20. Odczynniki konieczne do wykonania analizy zakupiono w firmie Abbott Laboratories. Odczynnik 1 zawierał przeciwciała przeciwko kwasowi walproinowemu w buforze fosforanowym, odczynnik 2 to kwas walproinowy znakowany fluoresceiną w buforze TRIS.

Krzywą kalibracyjną wykonano w oparciu o sześć kalibratorów w stężeniach: 0, 12,5, 25, 50, 100 i 150 g/ml. Roztwory kontrolne w stężeniach: 37,5, 72,5, 124,5 g/ml posłużyły do sprawdzenia poprawności metody.

Parametry walidacyjne zostały opracowane i zamieszczone w ulotce do odczynnika Valproic Acid Assay przez firmę Abbott Laboratories [4]. Według tej instrukcji wyznaczona czułość metody wynosiła 0,7 g/ml. Czułość ta odpowiada najniższemu mierzalnemu stężeniu, jakie może być odróżnione od wartości zerowej z 95% przedziałem ufności.

Metoda była liniowa w zakresie od 0 do 150 g/ml. Współczynnik wariacji pomiędzy dniami dla stężeń roztworów kontrolnych: 37,5, 72,5 i 124,5 g/ml wynosił odpowiednio: 3,4%, 4,1% i 3,5%.

Specyficzność testu kwasu walproinowego określono dla kwasu 3-ketowalproinowego, głównego metabolitu kwasu walproinowego. Przy stężeniu metabolitu odpowiadającym wysokim poziomom kwasu walproinowego w osoczu u chorych na padaczkę (16 µg/ml), kwas 3-ketowalproinowy wykazywał reaktywność krzyżową poniżej 10% zarówno przy dolnej (50 g/ml), jak i górnej (100 g/ml) granicy zakresu terapeutycznego kwasu walproinowego. Pozostałe metabolity kwasu walproinowego (kwas 3-hydroksywalproinowy, kwas 4-hydroksywalproinowy, kwas 4-en-walproinowy, 2-propyloglutaran, kwas 5-hydroksywalproinowy), przebadane w stężeniach odpowiadających ich wysokim poziomom w osoczu chorych na padaczkę, wykazywały błąd odczytu kwasu walproinowego poniżej progu czułości metody.

#### 3.3.2. Metoda chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS)

##### 3.3.2.1. Roztwory standardowe i kontrolne

Roztwór podstawowy kwasu walproinowego oraz deuterowanego standardu wewnętrznego (IS) VPA-d<sub>4</sub> w stężeniach 1 mg/ml sporządzono przez rozcieńczenie

metanolem roztworów wzorcowych odpowiednio kwasu walproinowego oraz VPA-d<sub>4</sub>. Roztwory robocze kwasu walproinowego przygotowano przez kolejne rozcieńczenie wodą destylowaną roztworu podstawowego do wartości 10 g/ml i 100 g/ml. Roztwór podstawowy VPA-d<sub>4</sub> rozcieńczano natomiast wodą destylowaną do stężenia 5 g/ml roztworu roboczego. Roztwory podstawowe kwasu walproinowego oraz jego deuterowanego standardu wewnętrznego przechowywano w +4°C. Roztwory robocze były przygotowywane codziennie świeże.

Roztwory standardowe sporządzano przez wzbogacenie materiału kontrolnego (surowicy bez dodatków obcych substancji) analitem w granicach stężeń od 5 do 150 g/ml. W podobny sposób przygotowywano próby kontrolne o stężeniach dla niskich wartości – 20 g/ml oraz dla wysokich – 75 g/ml.

### 3.3.2.2. Przygotowanie prób do oznaczeń

Do 2 ml próbek Eppendorfa pobierano 100 l surowicy (próby standardowe, kontrole i badane), które rozcieńczano 10-krotnie wodą destylowaną. Z tak przygotowanych rozcieńczeń pobierano 100 l roztworu, które wzbogacano dodatkiem 100 l standardu wewnętrznego – deuterowanego kwasu walproinowego w stężeniu 5 g/ml. Próby zakwaszono buforem cytrynianowym o pH = 3 w ilości 500 l, a następnie ekstrahowano 500 l octanu etylu przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po 6-minutowym odwirowaniu, rozpuszczalnik organiczny przenoszono do czystych próbek i odparowywano w strumieniu azotu.

Do suchej pozostałości dodawano 30 l mieszaniny derywatyzującej o składzie 1:1 BSTFA oraz pirydyny i po dokładnym zmieszaniu próby termostatowano w temperaturze ok. 70°C przez 20 minut.

### 3.3.2.3. Aparatura

Zastosowano chromatograf gazowy TRACE (Thermo Elektron, Stany Zjednoczone), który sprzężono z spektrometrem mas Polaris Q (Thermo Elektron, Stany Zjednoczone) wyposażonym w analizator mas typu kwadrupolowej pułapki jonowej z jonizacją elektronową.

### 3.3.2.4. Rozdział chromatograficzny

Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie kapilarnej factorFOUR, 30 m 0,25 mm I.D., grubość filmu 0,25 m (Varian, Stany Zjednoczone). Jako gaz nośny zastosowano hel przy stałym przepływie 1,5 ml/min.

Temperaturę injektora ustalono na 260°C. Program temperaturowy kolumny rozpoczęto przy 50°C, następnie temperaturę zwiększano z szybkością 40°C/minutę, aby osiągnąć temperaturę 300°C utrzymywaną przez kolejne 2 minuty. Na kolumnę chromatograficzną nastrzykiwano 1 l próby po derywatacji.

### 3.3.2.5. Parametry detekcji

Spektrometr mas pracował przy energii elektronowej 70 eV, temperaturze źródła jonów 230°C i temperaturze linii transferowej 280°C. Zbieranie jonów molekularnych prowadzono w opcji skanowania pełnego widma masowego m/z 50–350 dla obu związków, z wykorzystaniem oprogramowania Xcalibur.

### 3.3.2.6. Krzywa kalibracyjna i analiza ilościowa

Analizę ilościową przeprowadzono w oparciu o krzywą kalibracyjną sporządzoną przez wzbogacenie materiału kontrolnego, tj. surowicy z dodatkiem kwasu walproinowego w stężeniu 5, 10, 25, 50, 100, 150 µg/ml i deuterowanego standardu wewnętrznego (IS) VPA-d<sub>4</sub> w stężeniu 5 µg/ml. Każdą próbę wzorcową analizowano trzykrotnie. Wykorzystując stosunek pola powierzchni pod pikiem kwasu walproinowego do pola powierzchni IS względem stężenia analitu, sporządzano krzywą kalibracyjną. Do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej zastosowano metodę najmniejszych kwadratów obliczając współczynniki regresji liniowej – współczynnik przesunięcia i współczynnik nachylenia. Liniowość określająca zdolność metody do uzyskiwania wyników pomiaru analitycznego wprost proporcjonalnych do stężenia substancji oznaczanej w próbce wyrażono równaniem krzywej regresji ( $y = ax + b$ ) i współczynnikiem korelacji  $r$ .

### 3.3.2.7. Walidacja metody

Selektywność metody badano, wprowadzając na kolumnę chromatograficzną ekstrakty pięciu różnych próbek surowicy. Granicę wykrywalności ( $LOD$ ) metody, stanowiącą najmniejsze stężenie badanej próbki, które może być wykryte, ale niekoniecznie oznaczone z wymaganą dokładnością, obliczono ze stosunku sygnału analitu do szumu (wyliczonego z pola powierzchni piku), który szacowano 3/1. Granicę oznaczalności ( $LOQ$ ) metody stanowiącą najmniejsze stężenie oznaczanego składnika, które można zmierzyć z zadawalającą precyzją ( $RSD < 15\%$ ) i dokładnością (% błęd  $< 15\%$ ), wyrażono stosunkiem sygnału analitycznego do amplitudy szumów wynoszącym 10/1. W celu wyznaczenia powyższych parametrów walidacyjnych poddano analizie 5 próbek surowicy kontrolnej.

Wewnątrz- i zewnątrzgrupową precyzję oraz dokładność wyznaczono przez analizę próbek o niskim i wysokim stężeniu analitu, powtarzanych pięciokrotnie tego samego dnia przez trzy kolejne dni. Z otrzymanych wyników wyznaczono wartości średnie, odchylenia standardowe, względne odchylenia standardowe ( $RSD$ ) i obciążenie (Bias). Precyzję metody wyrażającą stopień zgodności pomiędzy pojedynczymi wynikami analizy, powtarzanymi wielokrotnie, określono za pomocą względnego odchylenia standardowego wyrażonego w procentach (%  $RSD$ ).  $RSD$  obliczono, dzieląc odchylenie standardowe

we przez średnie stężenie obliczone z krzywej kalibracyjnej. Dokładność określającą zgodność między wartością rzeczywistą a wartością będącą wynikiem analizy, przedstawiono jako wartość obciążenia metody sumą błędów systematycznych (% obciążenia). Obciążenie obliczono, dzieląc różnicę pomiędzy średnim stężeniem obliczonym a stężeniem odniesienia przez średnie stężenie badane.

Odzysk lub wydajność ekstrakcji (%) określającą zdolność do wyizolowania badanego związku z próby biologicznej przy zastosowanej procedurze ekstrakcji wyznaczono przy dwóch stężeniach prób kontrolnych dla pięciu powtórzeń. Względny odzysk ekstrakcji oszacowano przez dodanie roztworu roboczego standardu wewnętrznego IS do pierwszej serii prób surowicy przed ekstrakcją oraz do kolejnej serii po ekstrakcji, ale przed odparowaniem. Porównując stosunek sygnału badanego związku w pierwszej serii do sygnału z drugiej serii, wyznaczono względny procent odzysku analitu. Oceniono również całkowity odzysk, porównując sygnał analitu otrzymany z prób metanolowych roztworów wzorca.

### 3.4. Analiza statystyczna

Do obliczeń statystycznych zastosowano metodę analizy regresji liniowej oraz test t-Studenta dla prób zależnych przy wykorzystaniu programu Statistica 6.1. Wyniki stężeń VPA wyrażono średnim stężeniem, odchyleniem standardowym, a zależność wyników stężeń VPA pomiędzy metodami, opisano równaniem regresji liniowej.

### 3.5. Obliczenia toksykokinetyczne

Biologiczny okres półtrwania ( $t_{1/2}$ ) oraz stałą eliminacji ( $k_{el}$ ) wyliczono z końcowych punktów krzywych zależności stężenie-czas, wykorzystując program do obliczeń farmakokinetycznych (Spline Program for Pharmacokinetic Moment Analysis, DuPont Pharmaceuticals; Newark, Stany Zjednoczone).

## 4. Wyniki

Wstępna faza badań polegała na opracowaniu czułej i selektywnej metody ilościowego oznaczenia kwasu walproinowego i wyznaczeniu jej parametrów walidacyjnych.

### 4.1. Walidacja metody oznaczania kwasu walproinowego w surowicy techniką GC-MS

Identyfikację oznaczanego analitu przeprowadzono na podstawie czasu retencji uzyskanego z rozdziału chromatograficznego oraz wybranych jonów widma masowego dla kwasu walproinowego (jony o  $m/z = 129, 145,$

201). Czas retencji kwasu walproinowego i jego deuterowanego analogu wynosił 3,98 minuty (rycina 1). Podstawę analizy ilościowej stanowiły jony o  $m/z = 201$  dla kwasu walproinowego oraz  $m/z = 205$  dla deuterowanej pochodnej kwasu walproinowego VPA-d<sub>4</sub>.

Badając selektywność metody, nie zaobserwowano interferencji żadnych substancji endogennych zawartych w surowicy z oznaczanymi związkami. Krzywa kalibracyjna zbadana na sześciu punktach pomiarowych w pięciu powtórzeniach wykazywała liniowość w zakresie stężeń 5–150 g/ml. Współczynnik korelacji otrzymanej krzywej kalibracyjnej  $r$  wynosił 0,9959. W opisanych warunkach analitycznych granica wykrywalności ( $LOD$ ) wynosiła 2,6 g/ml, a granicę oznaczalności ( $LOQ$ ) oszacowano na 5 µg/ml.

Precyzję metody oceniano przy dwóch stężeniach (10 g/ml i 100 g/ml) powtórzonych pięciokrotnie tego samego dnia przez 3 kolejne dni. Względne odchylenia standardowe dla powtórzeń oznaczenia kwasu walproinowego tego samego dnia wynosiły odpowiednio: dla stężenia 10 g/ml – 2,6–9,4%; dla stężenia 100 g/ml – 7,9–9,4%, natomiast pomiędzy dniami wynosiły: dla stężenia 10 g/ml – 11,9%; dla stężenia 100 g/ml – 1,8%. Dokładność oceniona dla stężeń prób kontrolnych (20 g/ml i 75 g/ml) wahała się w granicach od 5,8% do 2,9%.

Wydajność ekstrakcji oszacowano przy dwóch stężeniach prób kontrolnych (20 g/ml i 75 g/ml) w pięciu powtórzeniach. Względny odzysk metody wahał się od 92,2 do 97,8%, a całkowity odzysk wynosił około 81%.

### 4.2. Porównanie metod analitycznych oznaczania stężenia kwasu walproinowego – analiza statystyczna

Opracowana i zwalidowana metoda GC-MS z jonizacją elektronową oraz metoda FPIA zostały zastosowane do oznaczeń stężenia VPA w surowicy sześciu pacjentów zatrutych preparatami kwasu walproinowego, leczonych w Klinice Toksykologii Collegium Medicum UJ w Krakowie. Materiał do badań pobierano kilkakrotnie podczas hospitalizacji w celu monitorowania eliminacji leku z organizmu.

Średnie stężenia kwasu walproinowego ( $\pm SD$ ) obliczone z 41 prób wyznaczonych metodami FPIA i GC-MS wynosiły odpowiednio 150,6 g/ml ( $\pm 139,6$ ) i 155,0 g/ml ( $\pm 135,8$ ).

Zależność wyników stężeń kwasu walproinowego w surowicy uzyskanych metodą FPIA względem metody GC-MS opisano równaniem regresji liniowej:  $CVPA/FPIA = 1,02$   $CVPA/GC-MS - 7,30$ , a współczynnik korelacji wynosił 0,9814. Zależność tę przedstawia rycina 2.

W przeprowadzonych badaniach związek pomiędzy stężeniem kwasu walproinowego wyznaczonym metodą

FPIA a GC-MS i względnymi różnicami stężeń kwasu walproinowego uzyskanymi metodą FPIA i GC-MS przedstawiono na rycinie 3.

#### 4.3. Wyniki oznaczeń kwasu walproinowego we krwi metodą FPIA i GC-MS

Podczas hospitalizacji pacjentów w Klinice Toksykologii CM UJ wykonywano oznaczenia kwasu walproinowego metodą FPIA na bieżąco po każdym pobraniu krwi. Pozostały materiał zabezpieczano do wykonania oznaczeń VPA metodą GC-MS w Zakładzie Medycyny Sądowej CM UJ. Wyniki oznaczeń kwasu walproinowego przedstawiono na rycinie 4. Dla czasu przyjęcia dawki toksycznej ( $t = 0$ ) założono stężenie 50 g/ml (dolny zakres stężenia terapeutycznego VPA), które wskazuje na terapeutyczne przyjmowanie preparatów kwasu walproinowego przez wszystkich pacjentów przed zatruciem.

#### 4.4. Parametry toksykokinetyczne

Wyniki stężeń kwasu walproinowego w surowicy pobranej w różnym czasie od chwili przyjęcia do szpitala wykorzystano do obliczeń wybranych parametrów toksykokinetycznych, tj. biologicznego okresu półtrwania ( $t_{1/2}$ ) oraz stałej eliminacji ( $k_{el}$ ). Biologiczny okres półtrwania oraz stała eliminacji kwasu walproinowego, obliczone u pięciu zatrutych pacjentów, wahały się odpowiednio w zakresie od 16,2 do 28,1 h (średnio 22,9  $\pm$  5,7) oraz od 0,043 do 0,024 h<sup>-1</sup> (średnio 0,032  $\pm$  0,009). U jednego pacjenta obliczone wartości  $t_{1/2}$  ( $k_{el}$ ) wynosiły 57,6 h (0,012 h<sup>-1</sup>). Zmiany stężenia kwasu walproinowego w czasie eliminacji w badanej grupie pacjentów przedstawiono na wykresach (rycina 4).

### 5. Dyskusja wyników

Znaczne zróżnicowanie farmakokinetyki kwasu walproinowego zależne od wieku i od towarzyszącej terapii przeciwpadaczkowej uzasadnia celowość monitorowania stężenia leku dla celów terapeutycznych [2]. Indywidualizacja dawkowania oparta o terapeutyczne monitorowanie leku poprawia skuteczność i bezpieczeństwo terapii farmakologicznej, jednak liczne interakcje farmakokinetyczne, towarzyszące schorzenia psychiatryczne, uciążliwość i nierzadko nieskuteczność terapii przy popularnym leczeniu preparatami kwasu walproinowego, prowadzą do coraz częstszych przedawkowań. Zmienność kinetyki kwasu walproinowego w zatruciach zależna od farmakokinetyki przy dawkach terapeutycznych wymusza konieczność monitorowania eliminacji leku z organizmu. Dlatego tak ważne i konieczne jest opracowanie czułej i specyficznej metody oznaczania kwasu walproinowego w surowicy w celu bezpieczeństwa te-

rapii przeciwpadaczkowej i zwiększenia skuteczności leczenia ostrych zatruc kwasem walproinowym.

Osoby zatrudnione w Pracowni Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej CM UJ, diagnozując pacjentów zatrutych preparatami kwasu walproinowego, wykorzystują do oznaczeń stężenia VPA we krwi metodą immunologiczną FPIA. Niewątpliwą zaletą tej metody jest szybkość oznaczenia badanej substancji bezpośrednio w materiale biologicznym, co pozwala w krótkim czasie postawić rozpoznanie i wdrożyć odpowiednie leczenie. Szybkość i prostota oznaczeń VPA metodą immunologiczną decyduje zatem o przydatności techniki FPIA do celów klinicznych. Metoda FPIA nie należy jednak do specyficznych metod analitycznych, dlatego też substancje o podobnej strukturze chemicznej do oznaczanego związku, jak np. metabolity, mogą wykazywać reaktywność krzyżową. Producent stosowanego testu gwarantuje specyficzność oznaczeń VPA dla wartości stężeń znajdujących się w zakresie stężeń terapeutycznych od 50 g/ml do 120 g/ml. Dotychczasowe dane zawarte w piśmiennictwie nie dostarczają informacji dotyczących reaktywności krzyżowej metabolitów kwasu walproinowego w zatruciu ostrym.

W prezentowanej pracy podjęto próbę oceny zastosowania metody FPIA do oznaczania stężeń toksycznych kwasu walproinowego w odniesieniu do metody referencyjnej. Opracowana metoda referencyjna oznaczania stężenia kwasu walproinowego w surowicy wykorzystuje technikę GC-MS z zastosowaniem deuterowanego analogu jako wzorca wewnętrznego. Przeprowadzona walidacja metody GC-MS oznaczania VPA wskazuje na jej specyficzność, czułość, powtarzalność i zakres liniowości na poziomie przydatności do rutynowych oznaczeń kwasu walproinowego w zakresie jego stężeń terapeutycznych. Ograniczenie liniowości metody do 150 g/ml wiązano z przeładowaniem pułapki jonowej przy wyższych wartościach stężeń, dlatego badane próby pochodzące od pacjentów zatrutych były rozcieńczane wodą destylowaną, a wynik był mnożony przez odpowiedni współczynnik rozcieńczenia.

Metoda GC-MS cechująca się wysoką specyficznością pozwala z największą wiarygodnością oznaczać stężenie kwasu walproinowego i jego metabolitów. Może być zatem wykorzystana w badaniu profilu metabolicznego leku, co autorzy zamierzają wykazać w kolejnej publikacji.

Porównanie wyników stężeń kwasu walproinowego wykonanych metodą FPIA oraz metodą GC-MS przeprowadzono na 41 próbach krwi pobranych od 6 pacjentów Kliniki Toksykologii CM UJ w Krakowie. Zgodnie z przeprowadzoną analizą regresji liniowej, nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy wynikami stężeń VPA otrzymanych metodą FPIA i referencyjną metodą GC-MS. Zależność wyników stężeń kwasu walproinowego opisano równaniem regresji, dla którego błę-



dy standardowe współczynników równania oszacowano następująco:  $SD = 0,022$  dla współczynnika kierunkowego i  $SD = 4,606$  dla wyrazu wolnego. Wartości współczynników regresji mieściły się w 95% przedziale ufności. Współczynnik korelacji wyników uzyskanych porównywanymi metodami wynosił 0,9814. Można zatem stwierdzić, że obie metody pomiaru stężenia kwasu walproinowego są sobie równoważne.

Test t-Studenta dla prób zależnych nie wykazał istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnimi stężeniami VPA oznaczonymi dwoma metodami przy 95% przedziale ufności ( $t_{40} = 1,49$ ,  $p = 0,1428$ ). Nie można więc twierdzić, że średnie wyniki stężeń otrzymane metodą FPIA są różne od średnich wyników stężeń oznaczonych metodą GC-MS. Nie wykazano także istotnej statystycznie różnicy dla odchyłeń standardowych w obu metodach.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, różnice pomiędzy stężeniami kwasu walproinowego wyznaczone metodą FPIA i GC-MS nie zależą od stężenia kwasu walproinowego. Problem ten ilustruje rycina 3.

Autorzy wcześniejszych doniesień naukowych porównywali stężenia kwasu walproinowego oznaczone metodami immunologicznymi w odniesieniu do wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej lub chromatografii gazowej jako metod referencyjnych. Również te badania wykazały brak istotnych statystycznie różnic w wynikach stężeń VPA uzyskanych pomiędzy wspomnianymi technikami [5, 15, 17, 18, 20].

Zwalidowane metody FPIA i GC-MS posłużyły do oznaczeń stężenia kwasu walproinowego w surowicy u pacjentów zatrutych preparatami kwasu walproinowego. Próbkę krwi od sześciu pacjentów były pobierane przy przyjęciu do szpitala, następnie dwukrotnie w pierwszej i drugiej dobie leczenia w celu monitorowania eliminacji leków, a później jednokrotnie w kolejnych dobach aż do osiągnięcia stężeń subterapeutycznych kwasu walproinowego.

Otrzymane wyniki stężeń kwasu walproinowego przy przyjęciu do szpitala u wszystkich sześciu pacjentów przekroczyły stężenie toksyczne kwasu walproinowego ( $> 150$  g/ml), a wahały się od 197,2 g/ml do 718,5 g/ml. Spiller i in. opisali występowanie korelacji pomiędzy stopniem zatrucia kwasem walproinowym a jego stężeniem we krwi. Obraz kliniczny zatrucia kwasem walproinowym z ograniczoną toksycznością ujawniali pacjenci, u których stężenia leku znajdowały się poniżej 450 g/ml, podczas gdy stężeniom kwasu walproinowego powyżej 850 g/ml towarzyszyły groźne dla życia objawy kliniczne, jak śpiączka, niewydolność oddechowa lub kwasica metaboliczna [19]. W przypadkach zatruc śmiertelnych notowano stężenia kwasu walproinowego we krwi w zakresie od 520 g/ml do 1970 g/ml [17]. U analizowanych sześciu pacjentów nie wystąpiły objawy zagra-

żające życiu, a stopień zatrucia zakwalifikowano od lekkiego do ciężkiego.

Dawki kwasu walproinowego przyjęte przez badanych pacjentów, a następnie określone na podstawie wywiadu lekarskiego w zakresie od 12 do 46 g, osiągały wartości dawek toksycznych (od 19 do 45 g), przy których obserwowano ciężkie objawy zatrucia. Kwas walproinowy jest jednak lekiem względnie mało toksycznym i powrót do zdrowia opisano po dawkach wynoszących nawet 75 g [16].

Podczas monitorowania eliminacji kwasu walproinowego z organizmu zatrutych pacjentów obserwowano profil farmakokinetyczny charakterystyczny dla modelu dwukompartamentowego, a eliminacja zachodziła zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Średnie wartości biologicznego okresu półtrwania ( $t_{1/2}$ ) i stałej eliminacji ( $k_{el}$ ) obliczone ze stężeń kwasu walproinowego wykonanych metodą FPIA wynosiły odpowiednio  $22,9 \pm 5,7$  h oraz  $0,032 \pm 0,009$  h<sup>-1</sup> i były zgodne z wcześniejszymi badaniami z wyjątkiem jednego pacjenta, którego  $t_{1/2}$  wydłużył się do 57,6 h, a  $k_{el}$  wynosiła 0,012 h<sup>-1</sup>. Biologiczny okres półtrwania kwasu walproinowego przy dawkach terapeutycznych mieści się w zakresie od 8 do 21,5 h (średnio  $12,2 \pm 3,7$  h). W wyniku przedawkowania może on ulec wydłużeniu dwu- lub trzykrotnie do wartości  $t_{1/2}$  powyżej 30 h [21]. Dotychczasowe badania wykazały, że  $t_{1/2}$  w zatruciu kwasem walproinowym osiągał wartości od 8,8 do 30,9 h (średnio  $15,4 \pm 8,8$  h) [23].

## 6. Podsumowanie

Zastosowane metody FPIA i GC-MS z jonizacją elektronową mogą być wykorzystane do rutynowych oznaczeń stężeń kwasu walproinowego w terapii monitorowanej oraz u pacjentów zatrutych preparatami kwasu walproinowego. Wykazano również, że wyniki stężeń VPA w surowicy oznaczone metodą immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym nie są statystycznie różne od wyników otrzymanych metodą referencyjną (GC-MS), co może dowodzić braku reaktywności krzyżowej przeciwciał w oznaczeniach VPA techniką FPIA.

Dobra korelacja pomiędzy wynikami uzyskiwanymi metodą FPIA i referencyjną metodą GC-MS oraz szybkość i prostota oznaczeń potwierdzają przydatność metody FPIA dla celów klinicznych.